● 講演録

血管内皮細胞の増殖と機能の制御ペプチド

三井 洋司

工業技術院 微生物工業技術研究所 〒305 つくば市東 1-1-3

はじめに

本日は「日本膜学会」にご招待いただきまして、近藤先生をはじめこのような機会を与えていただきましたことを感謝申し上げます。

膜学会には初めてでございますので、私の今日の研究の紹介がどのような形で皆様にお役にたっていたのかということを懸念しながらも、私なりのごく最近の仕事を紹介しつつ、最後皆さんと討論できれば幸いに存じます。

さきほど折田先生にご紹介いただきましたが、私のお話するペプチドの化学構造の2次元構造が図1に書いてあります。以前はエンドセリン- α とエンドセリン- β と仮称しておりましたけれども、この5月に完全に公表できるようになりましたので、新しい名前をそこに付けてあります。それはさきほどご紹介いただきましたように V. I. C. と略語にしております。この略語の意味はのちほど十分お話できますが、Vasoactive Intestinal Contractor (VIC) ということです。その生物活性を以前は名前も付けて公表するわけにいなかったのが α , β としましたけれども、本日そういう意味ではこの新しいペプチドの V. I. C. について発現部位まで含めてお話できる最初の機会だと存じます。

1. 血管機能の研究

我々の研究の戦略は、1つには生体中にある細胞の機能を極めて十分に維持し、発揮させたまま分離し、それを長期に使用できるように樹立し、その機能を制御するペプチドなり因子を発見し、その分子レベルでの機序を解明していくということでありまして。特に、その中で我々は血管系の細胞には非常に注目しております。皆さんのなかで、内皮細胞というのは単に血管の裏打ちをし

図1. ET と VIC

て血液に接している細胞層だと思われる方もいらっしゃるかもしれませんが、血管の内皮細胞というのは、単に血液と接しているだけではなくて、非常に様々の代謝をして有用物質を血液中に放出したり、あるいは血管機能そのものを制御しております。そういう意味で、内皮細胞は TPA をはじめ、いろんな有用物質を生産させることができます。その中で新しく発見してきたものが今申し上げますエンドセリン、およびその遺伝子ファミリーにかかわる物質です。内皮細胞は培養系で、維持いたしますと非常に生体内の状況をよく反映いたします。例えば完全に一層の細胞で培養できます。そこに多層化したしません。したがって、ほとんど生体内と全く同じように細胞が1列にぎっしりジュウタンのようになっているわけです。それを1つの細胞層というか、膜としての扱いも可能だと思うんです。それを透過する物質や細胞のトランスポートを研究することもできますし、あるいは細胞リアクターとしての考え方もできるわけです。そういう内皮細胞のいろんな使い方は別の機会にゆずり、本日の主題に入っていきたいと思います。

2. 内皮細胞の機能

血管には内皮細胞と平滑筋細胞があります。内皮というのは血液に接している細胞ですので、血球および血液成分といろんなインターアクションいたします。内皮細胞側が血液側だいたしますと、その外側にベースメントメンブレン(基底膜)を挿んで平滑筋細胞があるわけです。この平滑筋細胞は中膜にあるわけですが、中膜の平滑筋細胞というのは一層ではなくて重なり合うように存在して、機能としては特に、血管の収縮に関与しているわけです。

今まで血液中に血管の収縮を司る物質があるということとはアメリカのグループから報告されていました。我々は筑波大学グループと、この内皮細胞が産生する血管収縮因子を培養系で産生させ、物質の化学構造をあきらかにしようというプロジェクトが始まったわけです。この血管内皮細胞は機能をもっています。選択的な物質透過、脳血管バリアーとか抗血栓性に関与すること、あるいは脂質代謝の調節や各種血球細胞との相互作用、それから免疫機能の賦活、血圧の調節、あるいは血管新生等があります。これら各々を取り上げて説明したら大変な時間を要するほど大きな領域に現在なっております。そのうち本日は、血圧の調節に関与していると推定されるEDCFの本体であるエンドセリンを培養系で産生することができ、それについての新しい展開が始まって、このファミリーの1つであるV. I. C. というペプチドが遺伝子工学の手法で、また新しく見付かってきたというお話をしたいと思います。

3. 研究アプローチ

内皮細胞の生産する活性物質として非常に有用な物質が多数あります。そのうちさきほど申し上げたこの血管収縮因子が、内皮細胞でどうも作られているらしいとわかっていたんです。しかも血液成分には何しろ非常に多量の、あるいは多種類のタンパク成分が含まれておりますので、そこからこの因子の本体を見つけることがほとんど不可能でございました。そのために内皮細胞を生体外にもってきて、この培養系で生産させた物質を分離精製するというアプローチをしたわけです。そのための戦略としていくつかの道筋が考えられます。まず内皮細胞に生産させるために内皮細胞そのものを選択的に分離してくる。他の細胞が混入しないように分離しなければい

けない。それから、その内皮細胞を非常に大量培養するために内皮細胞にかかわる増殖因子、あるいはその制御因子を解明しておかなくてはいけない。3番目にそれ等を本当に十分使いこなすためには、内皮細胞が寿命をもっていてはこまるので、それを無限寿命化する。またこの細胞が血清を含む成分でしか培養できないと、血清中に含まれるタンパク成分等によるコンタミネーションのために分離精製ができない。目的物質の分離精製ができない。したがって血清など他の成分があまり入っていない培地で培養できるようにその細胞株を育種しなくてはいけない。そうしたことに基づいて、有用細胞株の無血清大量培養によって活性物質を生産する。そういう戦略であります。我々はこのステップで活性物質を見つけて以来、またそこからその遺伝子を見つけ、さらにその遺伝子をプローブにして、その遺伝子にホモロガスな新規遺伝子をクローニングし、そこからまた新しい活性物質を見つけてきたわけです。このような戦略で次々とやっております。

またこの活性物質の薬理活性をみるにあたっても、生物個体全体の系を使うのが理想的ですが、それでは十分な解析が進まない場合には、我々はそれをターゲット細胞である平滑筋の細胞を使って培養系で解明しております。また、この培養システムでのアッセイ系を活用してさらに薬理活性物質を分離しています。

4. 内皮細胞の分離と株化

まず細胞の選択的単離技術を示しますが、ブタの大動脈を縦に切ってから内膜面を上を開きます。その切り開いた大動脈の内膜面が上に見えます。その面が血液の流れているところ。血液成分に接しているところ、ここに内皮細胞が一層の細胞として存在するわけです。それをこの場合には物理的な方法ですが、極めて繊細な手、技術的にも繊細なやり方で外科用のメスを使ってけずり採りますと、細胞の厚さはせいぜい1ミクロン以下です。その層の内皮細胞だけが採れてくるわけです。この内膜直下に基底膜を挿んで他の細胞層があるわけです。他の細胞層を採らないように内皮細胞だけを採ってくるというのが選択的分離であります。そのように採ってきたブタの大動脈に由来する内皮細胞の1つの株が、このように培養系の中で極めて旺盛に増殖できます。いろんなところに分裂像も見えます。

内皮細胞の特徴ですが、ここに敷石状の細胞層がよく

見えます。この境界線がはっきりしています。分裂するようになりますと丸くなりまして少しころげて移動し、盛んに分裂しているわけです。ブタ由来の内皮細胞を使うことには1つ重要な理由があったのです。それはこのブタ由来内皮細胞が寿命をもたない不死化細胞として樹立し易いということです。

染色体レベルで見てみましても、生体から単離してきてしばらくの間は正常な染色体構造をもっておりますが、80回継代した頃には、染色体ナンバ4番のところに染色体付加が起こっております。その他3番のところに付加もおこっています。こういう具合に、染色体の非常にマイナーな部分に染色体異常が起こってまいります。このことが直接細胞の不死化と関係していたかどうかの証拠はもちろんありませんが、結果的にこのブタ由来内皮細胞が無限寿命化しました。

通常、ヒト由来の細胞は、ガン組織から採らない正常細胞の場合は、分裂回数に限りがありまして、ある程度分裂させると、どうしてもそれ以上は分裂させられません。もちろんガンウイルス等を感染させたりしますと、非常に稀なケースですが無限寿命化いたします。自然にはあまり形質転換しないのですが、このミニブタ由来の血管内皮細胞は、今400回分裂です。5年間も継代培養されています。実際に無限寿命化したと考えると確かなものです。その途中50数回のところまでの間に正常細胞と似たように増殖の低下がみられるんですが、やがて回復して一定の増殖速度を保ちます。このような細胞株を非常にたくさん得ております。しかし、得られている細胞株には、染色体の異常が全部みられます。そういう中で最も染色体異常の小さな細胞株、それを選んで我々は仕事を続けています。

5. 無血清培養細胞株の育種

最初に樹立したこの細胞株はまだ増殖因子として血清を10%必要としておりましたが、その親株から、血清成分を要求しないで増殖する細胞株を新しい変異株として開発しました。その株に対するメデュームはいわゆる無血清培養に使う培地で、Hymediumとか、SFMという市販の培地です。このメデュームで我々の確立したブタ内皮細胞を培養しますと、Hymedium単独では植え継いだ後、ほとんど増殖いたしません。機能維持はできるんですが、細胞がどんどん増えていくわけにはいきません。この培地に血清は全く含まれません。血清濃度

図2. 内皮細胞の無血清培養

HM: Hymedium,

ASF: ASF 301,

SFM: SFM 101

破線は添加直前の細胞数

をゼロにするために何日間もかけて血清を段階的に下げていって、細胞を次第に順応させていって完全に無血清培地にもっていったんですが、増殖はできません。ASF 301というのは「味の素」で販売している培地ですが、これは成分としてアルブミンを非常に大量に含んでおります。SFMこれはHymediumと非常に似た成分を含有しており、ASF 301のように増殖を起こし得ません。SFMは増殖因子としてトランスフェリン、EGFとインシュリンをHymediumの2倍量入ってます。ASFはさらにアルブミンが100 mg/l入っています。それでも血清中の1,000,000分の1の量なんです。

このアルブミンが入っているASF 301で結局増殖できたわけです。その系に我々は内皮細胞の増殖因子として知られるベーシック FGF を0.1 ng/ml 加えてみますと、Hymediumのようにトランスフェリンとインシュリンを少量しか入れていないメデューム中でも極めて旺盛に増殖することがわかりました。

6. エンドセリンの生産

このようにブタ大動脈内皮細胞は無限寿命化し、染色体変異が非常にわずかであり、それからタンパクとしてはトランスフェリン、インシュリン、FGF等既知タンパクを少量入れただけで極めて旺盛に増殖できる、そういうことがわかってきたわけです。このあとは培養を非常に大規模にもっていけば、この無血清培地中にある活性物質を極めて効率良く単離できるわけです。

そういう戦略のもとで、培地を集めた後、最終的に血

図3. ヒト臍帯静脈由来の正常内皮細胞
血管新生、エンドセリン産生など分化形質を保持し、
約70 PDLの分裂寿命をもつ正常細胞である。

管収縮活性をもった物質として構造決定されたのがエンドセリンです。筑波大学との共同研究としてNatureに発表されたものですから既に皆さんもその構造はご存知かも知れませんが、21個のアミノ酸から成り、システインを4つ持っている非常に稀な構造をもつペプチドです。これはちょうど昨年の4月に発表したわけです。我々それから一年後、さきほど少しふれましたように、この構造とほとんどそっくりのVICと名付けた新しいペプチドも発見したわけです。それは、エンドセリンのセリンとロイシンとメチオニンのところ、この3ヶ所が変わった同一長さのペプチドです。

一方エンドセリンに対する抗体を作りまして、生体内でどこで発現しているかということも調べております。これは神経内科の吉沢先生に染色をお願いして得られたものです。抗体は我々のものですが、血管部位のところ等が染色されている様です。恐らく内皮細胞がこれを確かに生体内でも生産し、内皮細胞で生産されたエンドセリンがその平滑筋を収縮するだろうということです。このエンドセリンが今度はブタではなくてヒト由来の内皮細胞でも本当に生産しているかどうか、遺伝子を発現しているかどうかということで、メッセンジャーRNAの発現制御の解析という仕事が進んだわけです。ヒト由来の内皮細胞はヘソの緒の静脈から採り出してきた細胞です。このヒト由来の内皮細胞で確かにエンドセリン前駆体のm-RNAが発現しております。武田薬品および筑波大のグループと共同して確実にしたのですが、ヒト由来のエンドセリンc-DNAとブタ由来のエンドセリンc-DNAの構造を解析したところ、やはり成熟

エンドセリンに相当する構造がヒトにも確かにある。しかもそれは完全にブタとヒトとで同一であったということです。さきほどの生理活性物質として培養液から単離したのはブタ由来のものです。その化学構造がc-DNAの中でヒト由来のと全く同一であったということで、ヒト内皮細胞から直接分離しておりませんが、實際上、同一物質であるということが確認されました。

このc-DNAを使って内皮細胞でどういうふうにしてそのメッセンジャーが誘導されてくるかという仕事が進んでおりまして、これも筑波大と私のところとで共同した研究成果です。内皮細胞のエンドセリンm-RNAの誘導にTPAとかイオノマイシンとか、いろんなものが関与することが確認されております。

7. 平滑筋細胞の収縮とCa

従来エンドセリンの生物活性はブタ冠動脈部分の血管細片の収縮を測定したり、あるいは血圧の上昇をみてきたのですが、我々はもう1つ別の方法を開発してまいりました。エンドセリンのメカニズムを突き詰めていけば、血管の平滑筋の収縮にあたるわけですから、平滑筋を直接収縮する系を作っていったわけです。血管の平滑筋細胞は生体の中では収縮できますけれども、培養系にもっていくと収縮できなくなってしまうんです。それは基本的に培養条件が悪い。培養のテクニックが悪い。あるいは機能維持を十分し得るような条件づけをしていないということです。我々はヒト大動脈由来の平滑筋細胞を選択的に分離培養して、その細胞に平滑筋としての収縮活性を発揮させたまま長期に継代培養できるようにいたしました。それを使ってエンドセリンを入れてやりますと、非常に速い時間に収縮したために細胞間に孔が多数できます。時間的経過をおって、この面積を測ることによって細胞が収縮したのを追うことができます。さらに進めて、細胞1個のレベルでどういう現象が起こっているかということを知りました。

ACAS (Anchorage Cell Analysis System) という機械の顕微鏡のもとにさきほどの細胞を培養しておきます。そこにIndo 1というカルシウムと結合し得る色素を入れておきまして、レーザー光線をあててカルシウムと結合した色素の量を測定するという方法で細胞内の遊離カルシウム量を測定することができます。またこれを映像でみることができます。したがって、細胞が収縮するならばその映像を追うことができますし、同時に細胞内

図 4. エンドセリン投与による平滑筋細胞の収縮とカルシウム濃度分布変化

のカルシウムの量も測定できます。

エンドセリンを入れる直前に平滑筋細胞は紡垂型をしておりまして、色はカルシウムの量を表しております。暗い青はカルシウムは非常に低いということ、だんだん明るい色になりますとカルシウムの量が高くなっており、全体で細胞内のカルシウム分布を示しております。そこにエンドセリンを約 10^{-7} M の濃度で入れていきますと、その直後はまだ変化しませんが、周辺に赤い色がチラチラと見えます。入れてから 18 秒後です。

細胞内で非常に大量に遊離のカルシウム量が増えていることを示します。約 54 秒後位です。その後、18 秒経つとさらにまた増えています。急速にふえまして、またぐっと下がっていきます。この時点まではまだ極端な細胞形態の変化はみられませんが、この直後から、収縮が観察されます。エンドセリンが平滑筋細胞の細胞膜受容

体に結合して、いろんな代謝を介して細胞内カルシウムの量を上げて、収縮を引き起こしているということです。これは正に細胞膜の現象であるわけです。細胞内カルシウムの量を測定して経時変化を示したものです。1~2 分で急激に上がりまして下がり、また上がって下がる。このフラクチュエーションは細胞によっていくらかのばらつきがあります。このような型で細胞内カルシウムのフリーの量の変動し、それが細胞の収縮にリンクしていると思います。

8. VIC の発見

エンドセリンが平滑筋細胞に対してこのように膜の興奮を引き起こして収縮させることを示しましたが、もう 1 つの筋収縮ペプチドを発見するため、我々が新しい戦略としてやってきた V. I. C. のお話をいたします。

まず我々はこの新しい遺伝子をマウスから探るための仕事から始めました。そのための材料として使ったのが、マウスの肝臓です。肝臓から DNA を採ってきまして切断し、その遺伝子ライブラリーを作ったわけです。プローブとしてヒトエンドセリン c-DNA あるいはその合成ヌクレオチドを用いてマウス DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、エンドセリンにホモログな遺伝子がいくつかあることを見出しました。マウスのエンドセリン関連遺伝子としてそのいくつかのクローンを解析いたしますと二つに分類されました。上流の領域にエンドセリンホモログな領域があるクローンと、下流の領域にそれがああるクローンとです。それらは完全に独立した二つの遺伝子であることが判明したわけです。それ等をプローブにして改めてサザーンブロットングで遺伝子をみてみますと、マウスには 3 種類の ET-ホモログな遺伝子があるということがわかりました。そして、最終的にそのうちの 2 つを構造決定をいたしまして、エンドセリン領域を比較しました。

そのうちの 1 つはヌクレオチドのレベルでヒト由来のそれとは違っておりましたが、アミノ酸レベルでみると、システイン-セリン-ロイシンと続く 21 個のペプチド構造がヒューマンやブタのものと同じです。成熟エンドセリンを外れた部分にはいくらか違っている配列もありますが、この部分では全く同一であるということがわかったわけです。一方、もう 1 つの遺伝子を解析いたしますと、それはこれと違う。当然ヒューマンのとも違うヌクレオチド、かつ違ったアミノ酸配列のペプチ

ドが発見されました。しかし違うといっても、21 個のうち大部分は非常に似ていて、ここで言えばセリンのところ、それからロイシン、それとメチニオンのところ、この 3 ヶ所だけ違うアミノ酸に置き換えられた、その他の 18 個のアミノ酸は全く同一の新規ペプチドだということがわかったわけです。

エンドセリン遺伝子はファミリーとして存在するといえます。そのうちの新しく見つかった V. I. C. は、セリンの部位がアスパラギン、ロイシンがトリプトファン、メチオニンがロイシンに変換しています。すでにエンドセリンについては内皮細胞が生産し平滑筋に作用することを申し上げましたが、それではこの新しい V. I. C. は何をしているんだと、それが非常に面白い状況になってきたわけです。

立体的な構造をみてみますと、ET と VIC はほとんど似ているわけですが、わずかに違います。場合によっては受容体を共有しているかもしれません。あるいはアンタゴニストかアゴニスト、コンペティターとして、働くかもしれません。実はこの時点ではこの新しい V. I. C. が偽遺伝子というか、遺伝子にはあるけれども実際には発現していないかもしれないという恐れがあるわけです。遺伝子があったからといって発現しているとは限らない。ペプチドとして生産されているとは限らないわけです。そういう意味で、この VIC が本当に発現されているか、どこの組織で発現されているか、内皮細胞で発現されているのだろうかということが非常に大きく注目されることであります。

9. VIC の生物活性

まず、この V. I. C. というものの活性ですが、エンドセリンと非常に活性の点でも似ているところがあります。それは血圧を上昇させるとか、血管を収縮させるという点です。だからといって血管に直接作用しているとは限りませんが、薬理的な活性としては非常に似ているということです。それではどの組織で作っているのかということですが、メッセンジャーが発現しているかどうかをさきほどの V. I. C. および ET の合成プローブを用いてノーサン分析で m-RNA を測定しました。かなりいろんな組織をやりましたが、最終的にエンドセリンは内皮細胞で発現し、V. I. C. は腸管において発現するということが確認されました。面白いことに双方お互いにスペシフィックでありまして、発現は他のところ

図 5. 回腸の収縮に対する用量依存性 VIC (●) と ET (■) の効果を、 10^{-5} M アセチルコリンによる収縮を 100 % として比較した。

では検出できないわけであります。ということこの V. I. C. は腸管で発現し、腸管に作用しているのではなかろうかと予想しました。この V. I. C. およびエンドセリンについて、モルモットとかマウスとかの回腸を用いてその収縮活性を調べたところ、この V. I. C. はエンドセリンよりもっと強い活性を示します。したがって、この V. I. C. というのはエンドセリンと遺伝子的には非常にホモログなファミリーを作っておりますが、発現部位は腸管であり、かつ腸管の収縮に対してエンドセリンよりもっと強い活性をもっているということで、われわれはこの V. I. C. が腸管ホルモンと断言まではいきませんが、そういう腸管ペプチドだということに思っております。したがって、このペプチドを Vasoactive Intestinal Contractor すなわち V. I. C. と名付けたわけです。Vasoactive とは血管にも作用するという意味で生理的にはおそらく Intestinal Contractor (腸収縮因子) であろうということです。いわゆる V. I. P. というペプチドがありますね、弛緩する方の作用をもっておりますが、一方 V. I. C. は収縮の活性をもっているので V. I. C. という名称はゴロ合わせにもちょうどいいということと、まあ研究にも成功したので、Victory という意味も含めてこういうふう命名したわけです。

腸管ペプチドというのは、まあだいたい神経ペプチ

ドとしても働いているわけですので、脳・腸管ホルモンの面からも非常に注目しております。

おわりに

以上まとめますと、我々はまず基本的に細胞培養技術を十分に駆使して細胞の増殖と機能を制御し、そこから新しい生理活性物質を見出し、またそれを土台にして遺伝子操作技術でさらに新規の活性物質を見出し、それ等の生合成の機序を解析しつつ、その生理的あるいは病理的な役割を解明しようと思っているわけです。また、その薬理活性を解明するにあたって、細胞を単離した培養系においてそのメカニズムを解明できるとしております。膜学会との関連で申し上げれば、培養系で平滑筋細胞の膜の興奮のメカニズム、これは平滑筋ではあまりやられておりませんので、細胞レベルで解明することにも役立っており、あるいは内皮細胞による血液成分の透過制御、それも細胞膜を介して行われていると思いますが、そういう研究面で皆さんと何らかの方法で協力し合うことを期待いたしましてお話を終わりたいと思います。

参考文献

- 1) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, M., Goto, K. and Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332 (31); 411-415, 1988
- 2) Itoh, Y., Yanagisawa, M., Ohkubo, S., Kimura, S., Kosaka, T., Inoue, A., Ishida, N., Mitsui, Y., Onda, H., Fujino, M. and Masaki, T. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS letters*, 231 (2); 440-444, 1988
- 3) Ishida, N., Nishimatsu, S., Saida, K., and Mitsui, Y. Mouse hexamer repeat sequences homologous to the *Drosophila* "Period" gene. *Nucleic Acids Research* 16 (8); 3581, 1988
- 4) Suzuki, T., Koga, N., Imamura, T. and Mitsui, Y. A novel growth factor in rat spleen which promotes proliferation of hepatocytes in primary culture. *B. B. R. C.*, 153 (3); 1123-1128, 1988
- 5) Imamura, T., Tokita, Y. and Mitsui, Y. Purification of basic FGF receptors from rat brain *B. B. R. C.*, 155 (2); 583-590, 1988
- 6) Miyagawa, K., Saamoto, H., Yoshida, T., Yamashita, Y., Mitsui, Y., Furusawa, M., Maeda, S., Takaku, F., Sugimura, T. and Terada, M. hst-1 transforming protein: expression in silkworm cells and characterization as a novel heparin-binding growth factor *Oncogene*, 3: 383-389, 1988
- 7) Hasegawa, N., Yamamoto, M., Imamura, T., Mitsui, Y. and Yamamoto, K. Evaluation of long-term cultured endothelial cells as a model system for studying vascular ageing *Mech. Ageing Dev.*, 46; 111-123, 1988
- 8) Nishimatsu, S., Murakami, K., Mitsui, Y. and Ishida, N. Mouse spleen derived cDNA clones containing per repeat sequence *Nucleic Acid Res.*, 16 (24); 11831-11832, 1988
- 9) Ishida, N., Tsujioka, K., Tomoi, M., Saida, K. and Mitsui, Y. Differential activities of two distinct endothelin family peptides on ileum and coronary artery *FEBS letters*, 247; 337-340, 1989
- 10) Mitsui, Y., Cell Culture System for Aging Study Report of Special Project on Evolution of Matter II, Univ. of Tsukuba, 225-237, 1989
- 11) Yanagisawa, M., Inoue, A., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M. and Masaki, T. The Human Preproendothelin-1 Gene: Possible Regulation by Endothelial Phosphoinositide Turnover Signaling *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 13 (Suppl. 5): S 13-S 17, 1989
- 12) Saida, K., Mitsui, Y., and Ishida, N. Ishida A Novel Peptide, Vasoactive Intestinal Contraction, of a New (Endothelin) Peptide Family*, *MOLECULAR CLONING, EXPRESSION AND BIOLOGICAL ACTIVITY**. *J. Biol. Chem.*, 264, 14613-14616, 1989
- 13) Tao Fu, Wei Chang, Norio Ishida, Kaname Saida, Youji Mitsui, Yukio Okano and Yoshinori Nozawa Effects of vasoactive intestinal contraction (VIC) and endothelin on intracellular calcium level in neuroblastoma NG 108-15 cells *FEBS LETTERS*, 257 (2), 351-353, 1989
- 14) Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M. and Masaki, T. The Human Preproendothelin-1 Gene; complete nucleotide sequence and regulation of expression *J. Biol. Chem.*, 264 (25), 14954-14959, 1989